

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

28.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月 1日

REC'D 25 APR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-055853

[ST.10/C]:

[JP2002-055853]

出願人

Applicant(s):

天野エンザイム株式会社

PRIORITY

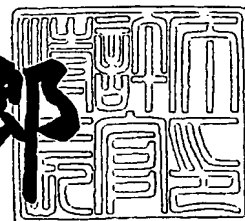
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3024206

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-647

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県各務原市須衛町四丁目 179番35 天野エンザ
イム株式会社 岐阜研究所内

【氏名】 鈴木 哉子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院生命農
学研究科

【氏名】 塚越 規弘

【特許出願人】

【識別番号】 000216162

【氏名又は名称】 天野エンザイム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095577

【弁理士】

【氏名又は名称】 小西 富雅

【選任した代理人】

【識別番号】 100100424

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 知公

【選任した代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 045908

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201265

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 改変プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN（第 1 塩基配列：配列番号 1）を含む第 1 DNA断片と、CGGNNNNNNNNGG（第 2 塩基配列：配列番号 2）を含む第 2 DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

【請求項 2】 前記第 1 塩基配列がCCAATTAGAAG（配列番号 3）である、請求項 1 に記載の改変プロモーター。

【請求項 3】 前記第 2 塩基配列がCGGHNWWWWNWHGG（配列番号 4）である、請求項 1 又は 2 に記載の改変プロモーター。

【請求項 4】 前記第 2 塩基配列がCGGWWWWWWWHGG（配列番号 5）である、請求項 1 又は 2 に記載の改変プロモーター。

【請求項 5】 前記第 2 塩基配列がCGGAAATTTAAAGG（配列番号 6）、CGGAATTAAACGG（配列番号 7）又はCGGAAATTTAACGG（配列番号 8）である、請求項 1 又は 2 に記載の改変プロモーター。

【請求項 6】 前記プロモーターの 5' 末端側から 3' 末端側に向かって順に第 1 DNA断片、第 2 DNA断片が並ぶよう挿入される、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の改変プロモーター。

【請求項 7】 前記プロモーターに存在するCCAAT配列よりも 5' 側上流域、又はプロモーター領域に存在するSRE領域よりも 3' 側下流域に前記第 1 DNA断片及び前記第 2 DNA断片が挿入される、請求項 6 に記載の改変プロモーター。

【請求項 8】 複数個の前記第 1 DNA断片及び複数個の前記第 2 DNA断片が挿入される、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の改変プロモーター。

【請求項 9】 前記第 1 DNA断片と前記第 2 DNA断片が同じ数ずつ挿入される、請求項 8 に記載の改変プロモーター。

【請求項 10】 一つの第 1 DNA断片と一つの第 2 DNA断片とが組みをなし、かつ各組において第 1 DNA断片が前記プロモーターの 5' 末端側に位置するように、前記プロモーターに前記第 1 DNA断片と前記第 2 DNA断片が挿入される、請求項 9 に記載の改変プロモーター。

【請求項 1 1】 糸状菌で機能するプロモーターに、配列番号 9 の塩基配列を有する DNA 断片、又は該 DNA 断片の一部が改変された DNA 断片であってエンハンサー機能を有する DNA 断片を 1 ～ 数個組込んでなる改変プロモーター。

【請求項 1 2】 前記糸状菌で機能するプロモーターがアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターである、請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の改変プロモーター。

【請求項 1 3】 CGGAATTTAAACGG（配列番号 7）又は CGGAAATTTAACGG（配列番号 8）の塩基配列からなる、エンハンサー機能を有する DNA 断片。

【請求項 1 4】 糸状菌で機能し、かつ請求項 1 3 の DNA 断片を含む、改変プロモーター。

【請求項 1 5】 請求項 1 ～ 1 2、及び請求項 1 4 のいずれかの改変プロモーターが組込まれたベクター。

【請求項 1 6】 請求項 1 ～ 1 2、及び請求項 1 4 のいずれかの改変プロモーターが組込まれ、されに該改変プロモーターの制御下に目的のタンパク質の構造遺伝子が組込まれたベクター。

【請求項 1 7】 請求項 1 6 のベクターを、前記構造遺伝子を発現可能に保有する糸状菌形質転換体。

【請求項 1 8】 請求項 1 ～ 1 2、及び請求項 1 4 のいずれかの改変プロモーターと、及び目的のタンパク質をコードし、該改変プロモーターの制御下にある構造遺伝子と、を保有する糸状菌。

【請求項 1 9】 請求項 1 8 の糸状菌を、前記タンパク質を産生可能な条件で培養し、産生されたタンパク質を回収する、ことを特徴とするタンパク質の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明が属する技術分野】

本発明はタンパク質の生産に利用されるプロモーターの改良に関する。詳しくは、糸状菌で機能するプロモーターに改変を施して得られる改変プロモーターに関する。また、当該改変プロモーターを利用したタンパク質の生産系に関する。

【0002】

【従来の技術】

アスペルギルス属糸状菌は、各種の酵素タンパク質を菌体外に多量に分泌生産することが確認されている。例えば、工業的に利用されているアスペルギルス・オリゼでは培養液1リットル当たり数十g以上の酵素タンパク質を生産するといわれており、糸状菌を宿主とすることにより同種・異種のタンパク質の高い分泌生産が可能である。また、糸状菌の中には古来より醸造製品の生産に利用されている株も多く、安全性の面からもタンパク質生産に適しているといえる。そのため、近年、遺伝子組換えによる有用タンパク質の生産用宿主として糸状菌を利用した例が報告されるようになってきた。分泌型タンパク質を生産する場合、その生産量は目的の遺伝子の発現からタンパク質の修飾、そして分泌に至る過程における様々な要因によって決定されている。タンパク質の生産量を増大させる最も有効な手段は、タンパク質生産過程の第1段階である目的遺伝子の転写効率を高めること、即ち転写量を増大させることである。このような観点から、これまでに種々の糸状菌由来のプロモーターが単離され、それらを用いたタンパク質の生産系が報告されている。例えば、アスペルギルス・オリゼのアミラーゼ遺伝子のプロモーター (Biotechnology, 5, 368(1987)、特開昭62-272988号公報)、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター (Biotechnology, 6, 1419(1988)) 等が単離され、利用に供されている。

【0003】

このように、いくつかのプロモーターが利用されているものの、プロモーターに関する遺伝子発現機構はあまり解明されていないのが現状である。これまでのところ、転写制御因子として遺伝子のカタボライト抑制制御に関与する因子 (Mol. Microbiol., 7, 847-857(1993))、広域転写活性化因子であるHAP複合体の結合因子 (Mol. Gen. Genet., 237, 251-260(1993))、デンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子 (Mol. Gen. Genet., 262, 668-676(1999)) などが報告されているのみである。そのため、糸状菌を用いて有用タンパク質を効率よく生産する試みとしては、主として古典的な育種による高生産菌の作出や、天然に存在する、より高い発現プロモーターを単離することが行われてきた。しかしながら、こ

これらの試みは多大な労力を要し、また偶然性に大きく依存することから高発現プロモーターを取得できる可能性は低い。一方、プロモーターの発現調節力を改良することができれば、このような問題点が大幅に解消されることとなる。これまでも、プロモーターの発現調節力を改良する試みとしてアスペルギルス・オリゼの α -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーターに改変を施したもの (Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 459-467 (1998)、特開平9-9968号公報) などが報告されている。しかし、これらの改変プロモーターではある程度の発現調節力の向上がみられるものの、タンパク質の生産が効率的に行える程の十分な発現活性が得られているとはいえず、目的のタンパク質遺伝子をより効率的に転写できるプロモーターを開発することが切望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は以上の背景の下なされたものであって、その目的はプロモーターの発現制御に関与する塩基配列を提供することである。また、この塩基配列の情報を基にプロモーターの改変を行い、高い発現活性を有する改変プロモーターを提供することを目的とする。更には、この改変プロモーターを用いて糸状菌を宿主とするタンパク質の効率的な発現系（生産系）を構築することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記目的に鑑み以下の検討を行った。即ち、プロモーター活性が高いことで知られるアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子に着目し、このプロモーターを改変してより転写活性の高い改変プロモーターを取得することを試みた。その結果、プロモーター領域に挿入することによってその転写活性を増強することができる一組の配列を見出した。そして、この配列により改変されたプロモーターを用いることにより、アスペルギルス・ニドランスのアミラーゼ高生産株を取得することができた。さらに検討を行ったところ、改変プロモーターを有するアミラーゼ遺伝子が多コピー組込まれた株ではより効率的なタンパク質の産生が認められた。

以上の検討結果から、新規に見出された配列はプロモーター領域の改変に極め

て有効であり、これを利用すれば糸状菌を宿主とするタンパク質の効率的な発現系を構築できるとの知見が得られた。

【0006】

一方、当該配列を複数個用いてプロモーターの改変を行った場合の効果をアミラーゼの発現系をモデルとして検討した。その結果、当該配列が複数組込まれた改変プロモーターを用いれば、炭素源をグルコースとした場合であっても良好にアミラーゼを産生させ得ることが判明した。即ち、野生株においては培地中のグルコースによって発現抑制（カタボライト抑制）がかかるところ、当該配列を複数個挿入した改変プロモーターを用いればこのカタボライト抑制を解除できることが示された。このことから、この新規に見出された配列はプロモーター活性の抑制に関与する機構をブロックないしは解除することにも有効であると示唆された。

また、SREの有するエンハンサー機能に注目し、これに種々の変異を施してその改善を試みたところ、SREよりも優れたエンハンサー機能を有する配列を取得することに成功した。

【0007】

本発明は以上の知見に基づき完成されたものであって、以下の構成を提供する。

[1] 糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNN（第1塩基配列：配列番号1）を含む第1 DNA断片と、CGGNNNNNNN GG（第2塩基配列：配列番号2）を含む第2 DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

[2] 前記第1塩基配列がCCAATTAGAAG（配列番号3）である、[1]に記載の改変プロモーター。

[3] 前記第2塩基配列がCGGHNWWWWNWHGG（配列番号4）である、[1]又は[2]に記載の改変プロモーター。

[4] 前記第2塩基配列がCGGWWWWWWWHGG（配列番号5）である、[1]又は[2]に記載の改変プロモーター。

[5] 前記第2塩基配列がCGGAAATTTAAAGG（配列番号6）、CGGAATTTAAACGG（配列番号7）又はCGGAAATTTAACGG（配列番号8）である、[1]又は[2]に記載の

改変プロモーター。

[6] 前記プロモーターの5'末端側から3'末端側に向かって順に第1 DNA断片、第2 DNA断片が並ぶよう挿入される、[1]～[5]のいずれかに記載の改変プロモーター。

[7] 前記プロモーターに存在するCCAAT配列よりも5'側上流域、又はプロモーター領域に存在するSRE領域よりも3'側下流域に前記第1 DNA断片及び前記第2 DNA断片が挿入される、[6]に記載の改変プロモーター。

[8] 複数個の前記第1 DNA断片及び複数個の前記第2 DNA断片が挿入される、[1]～[7]のいずれかに記載の改変プロモーター。

[9] 前記第1 DNA断片と前記第2 DNA断片が同じ数ずつ挿入される、[8]に記載の改変プロモーター。

[10] 一つの第1 DNA断片と一つの第2 DNA断片とが組みをなし、かつ各組において第1 DNA断片が前記プロモーターの5'末端側に位置するように、前記プロモーターに前記第1 DNA断片と前記第2 DNA断片が挿入される、[9]に記載の改変プロモーター。

[11] 糸状菌で機能するプロモーターに、配列番号9の塩基配列を有するDNA断片、又は該DNA断片の一部が改変されたDNA断片であってエンハンサー機能を有するDNA断片を1～数個組込んでなる改変プロモーター。

[12] 前記糸状菌で機能するプロモーターがアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターである、[1]～[11]のいずれかに記載の改変プロモーター。

[13] CGGAATTTAAACGG (配列番号7) 又はCGGAAATTTAACGG (配列番号8) の塩基配列からなる、エンハンサー機能を有するDNA断片。

[14] 糸状菌で機能し、かつ[13]のDNA断片を含む、改変プロモーター。

[15] [1]～[12]、及び[14]のいずれかの改変プロモーターが組込まれたベクター。

[16] [1]～[12]、及び[14]のいずれかの改変プロモーターが組込まれ、さらに該改変プロモーターの制御下に目的のタンパク質の構造遺伝子が組込まれたベクター。

[17] [16]のベクターを、前記構造遺伝子を発現可能に保有する糸状菌形質転換体。

[18] [1]～[12]、及び[14]のいずれかの改変プロモーターと、及び目的のタンパク質をコードし、該改変プロモーターの制御下にある構造遺伝子と、を保有する糸状菌。

[19] [18]の糸状菌を、前記タンパク質を産生可能な条件で培養し、産生されたタンパク質を回収する、ことを特徴とするタンパク質の生産方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の構成を詳細に説明する。尚、本発明においてプロモーター活性を高めることができる機能を「エンハンサー機能」という。

本発明者らは、まずアスペルギルス属に広く保存されているプロモーター領域のCCAAT配列（配列番号3）及びSRE（配列番号6）に注目し、これらを外来的にプロモーター領域に挿入した場合のプロモーター活性への影響を検討した。始めに、アスペルギルス・オリゼJCM02239株のタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドを構築した。一方、CCAAT配列を含むDNA断片及びSREを含むDNA断片をそれぞれ取得した。そして、これら各DNA断片を上記のプラスミドのプロモーター領域にそれぞれ単独で挿入して改変プロモーターを構築した。次に、各改変プロモーターとタカアミラーゼA遺伝子のコーディング領域を含んだプラスミドを調製した。このようにして得られた各プラスミドを用いてアスペルギルス・ニドランスをそれぞれ形質転換し、各形質転換体のアミラーゼ活性を比較した。その結果、CCAAT配列或いはSREが挿入された改変プロモーターを有する形質転換体のアミラーゼ活性は、改変を施さないプロモーターを有する形質転換体のそれよりも低いか、又はほとんど差がなかった。また、複数のCCAAT配列又は複数のSREを挿入してプロモーターの改変を行った場合についても検討したが同様にプロモーター活性の上昇は認められなかった。以上の結果から、CCAAT配列又はSREを単独でプロモーター領域に挿入して改変を行ったとしてもプロモーター活性を上昇させることはできないと予測された。

【0009】

そこで、次にCCAAT配列及びSREを組み合わせてプロモーターの改変を行った場合におけるプロモーター活性の変化について検討した。まず、アスペルギルス・オリゼJCM02239株のタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター領域を鋳型として、CCAAT配列及びSREを含むDNA断片（CCAAT-SRE断片：配列番号9）を作製した。このDNA断片を用いて、上記と同様の方法によりタカアミラーゼA遺伝子の改変プロモーターを作製した。次いで、この改変プロモーター及びタカアミラーゼA遺伝子のコーディング領域を含むプラスミドを構築した後、このプラスミドを用いてアスペルギルス・ニドランスの形質転換株を得た。この形質転換株のアミラーゼ活性を測定したところ、改変を施さないプロモーターを有する形質転換株（野生株）に比較して顕著なプロモーター活性の上昇が認められた。このことから、プロモーター領域にCCAAT配列とSREを併せて挿入することにより、高い活性を有する改変プロモーターを作製できることが判明した。

【 0 0 1 0 】

ここで、一般に、DNA配列の一部の塩基を置換したとしてもそのDNA配列が有する機能を維持できる場合がある。ところで、CCAAT配列は広域転写活性化因子（HAP）の結合配列として知られ、その結合には5'末端側の配列CCAATが重要であることが報告されている。したがって、この5'末端側のCCAAT以外の塩基を置換したとしてもCCAAT配列の有するエンハンサー機能が維持されることが予想される。

【 0 0 1 1 】

一方、本発明者らはSREのエンハンサー機能が一部の塩基を置換した場合にも維持されるかどうかを検討した。まず、SREの一部が置換されるように設計したプライマーを用いたPCR反応によって、タカアミラーゼA遺伝子のプロモーター領域のCCAAT配列及び一部の塩基が置換されたSRE（CGGAATTTAAACGG：配列番号7）を含むDNA断片を取得した。そして、上記と同様の方法でこのDNA断片を挿入して改変を行った改変プロモーターを作製し、次いで改変プロモーターを有するタカアミラーゼA遺伝子が組込まれたアスペルギルス・ニドランスの形質転換株を取得した。この形質転換株におけるアミラーゼ活性を測定した結果、上記のCCAAT-SRE断片による改変プロモーターを用いた場合とほぼ同様のアミラーゼ活性の上

昇が認められた。このことから、SREの一部に塩基置換を施したとしても、場合によってはそのエンハンサー機能を維持できることが示された。特に、5'末端側から数えて6番目、9番目及び12番目の塩基については、これらを他の塩基に置換したとしてもSREのエンハンサー機能はほとんど影響を受けないことがわかった。

【 0 0 1 2 】

以上の知見を得た後、SREがエンハンサー機能を発揮する上で重要な部分（配列）を突き止めるべく、野生型プロモーターに存在するSREに変異を施した改変プロモーターを作製しそのプロモーター活性を調べた。その結果、SREの5'末端側から12番目の塩基をCに置換した場合にはSREの有するエンハンサー機能が維持されるところか増強される現象が観察された。この結果から、5'末端側から12番目の塩基を置換してもSREのエンハンサー機能を維持できること、及びSREにおいて5'末端側から12番目の塩基をCとした配列（CGGAAATTTAACGG：配列番号8）はSREよりも優れたエンハンサー機能を有することが判明した。

一方、5'末端側から13番目及び14番目の塩基については、これらを他の塩基に置換することによって野生型プロモーターよりも活性が低下した。このことと、当該配列部分についてはアスペルギルス属において広く保存されていることが知られていることとを考慮すれば、これらの塩基については他の塩基に置換しないことが望ましいと考えられる。また、SREの5'末端のCGGについてもアスペルギルス属において広く保存されていることが知られており、この配列部分についても他の塩基に置換しないことが望ましいと考えられる。

【 0 0 1 3 】

一方、アスペルギルス属の野生株において、SREの配列がCGGTCTTTTGTCGG（アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼ）、及びCGGCGAATTCACGG（アスペルギルス・オリゼのグルコアミラーゼ）であるものが知られており、またこれらの野生株においてプロモーター活性が低下していることは報告されていない。これらの配列とアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼ遺伝子においてプロモーターに存在するSREとを比較すれば、5'末端側から数えて4番目、5番目、7番目、10番目、及び11番目の塩基については共通しておらず、これらの塩基はSRE

が有するエンハンサー機能に対する寄与の程度が低いものと考えられる。即ち、これらの塩基を他の塩基に置換したとしても、SREが有するエンハンサー機能が維持される可能性が高いと考えられる。具体的には、5'末端側から数えて4番目の塩基についてはT又はC、5番目の塩基についてはC又はG、7番目の塩基についてはA、10番目の塩基についてはG又はC、11番目の塩基についてはTであってもエンハンサー機能を有するものと考えられる。但し、個々の塩基の構造に起因する結合性などを考慮すれば、5'末端側から数えて6番目～9番目の塩基及び11番目の塩基、更に好ましくは5'末端側から数えて4番目～11番目の塩基はA又はTであることが望ましいと考えられる。

【 0 0 1 4 】

以上の知見及び考察より、本発明でプロモーター領域の改変に用いられる第1 DNA断片の塩基配列は、好ましくはCCAATTAGAAG（配列番号3）である。他方、第2 DNA断片の塩基配列は、好ましくはCGGHNWWWWNWHGG（配列番号4）、更に好ましくはCGGWWWWWWNWHGG（配列番号5）であり、更に更に好ましくはCGGAAATTTAAAGG（配列番号6）、CGGAATTTAAACGG（配列番号7）又はCGGAAATTTAAACGG（配列番号8）である。ここで、塩基配列中のNはA（アデニン）、G（グアニン）、C（シトシン）、又はT（チミン）であることを、WはA（アデニン）又はT（チミン）であることを、HはA（アデニン）、C（シトシン）又はT（チミン）であることをそれぞれ表す。

【 0 0 1 5 】

また、上述のようにSREの5'末端側から数えて12番目の塩基をCに置換して得られる配列は、それ自体でSREよりも優れたエンハンサー機能を有することが判明したことから、この配列のみを用いてプロモーターの改変を行うことができる。即ち、当該配列（CGGAAATTTAAACGG：配列番号8）はプロモーターの改変に有用なものであり、当該配列を単独で利用することによって高い活性のプロモーターを構築できる。また、上記の配列CGGAATTTAAACGG（配列番号7）についても、CCAAT配列と同時に用いた場合の結果ではあるものの野生型のSREと同等のエンハンサー機能が認められたことから、この配列も単独でプロモーター活性の増強に利用できるものと予想される。尚、ここでいう「利用」には、野生型のプロモ

ーター（既に他の改変を施したものを含む）にもともと存在するSREの一部に塩基置換して上記の配列を構築すること、及び上記の配列を有するDNA断片を野生型のプロモーター（既に他の改変を施したものを含む）に挿入することを含む。また、ここでの「単独」とは、上記の第1 DNA断片を同時に用いないことを意味する。

【0016】

一方、本発明者らはCCAAT-SRE断片の挿入によるプロモーター領域の改変とカタボライト抑制との関係について検討した。まず、CCAAT-SRE断片を一つ挿入した改変プロモーター、及び二つ挿入した改変プロモーターを作製した。そして、これらの改変プロモーターのいずれかを含有タカアミラーゼ遺伝子が挿入された形質転換体をそれぞれ調製し、炭素源としてグルコースを含む培地で生育した菌体のアミラーゼ活性を比較した。その結果、CCAAT-SRE断片が一つ挿入された改変プロモーターを有する菌体についてはカタボライト抑制がかかりアミラーゼ活性が低下したが、CCAAT-SRE断片が二つ挿入された改変プロモーターを有する菌体についてはカタボライト抑制の程度が低く、改変を施さないプロモーターを有する菌株の40倍以上のアミラーゼ活性が認められた。

かかる知見より、カタボライト抑制を解除するという効果が得られる点において、CCAAT断片及びSRE断片を複数挿入してプロモーター領域の改変を施すことが好ましい。

【0017】

本発明の第1 DNA断片及び第2 DNA断片は、例えば市販のDNA合成機を用いて合成することができる。また、例えばアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター領域を鋳型とし、適当なプライマーを用いたPCR法によって調製することもできる。

第1 DNA断片及び第2 DNA断片を含む一つのDNA断片を調製し、これを糸状菌で機能するプロモーターへ組込むことにより、本発明の改変プロモーターを作製することもできる。例えば、アスペルギルス属などにおけるプロモーターの中から第1 DNA断片及び第2 DNA断片に相当する配列を内包するプロモーターを選択し、これを鋳型としたPCR法などを行うことによって、このようなDNA断片を調製する

ことができる。鋳型として用いることができる好適なプロモーターの例としては、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター（配列番号 1 2）を挙げることができる。本発明でプロモーターの改変に用いられるDNA断片の塩基配列の一例を配列番号 9 に示す。このDNA断片（CCAAT-SRE断片）は、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子におけるプロモーター領域の一部（240位～367位（転写開始点を+1として-312位～-185位））である。尚、このDNA断片に一部の改変を施したDNA断片であっても、それが組込まれるプロモーターの活性を高める機能（エンハンサー機能）を有する限り、プロモーター領域の改変に利用できる。ここで、一部の改変とはDNA断片を構成する一部の塩基が置換、欠失される場合、又は1～数個の塩基が付加若しくは挿入される場合をいう。このような改変が許容される程度は、改変が行われるDNA断片上の部位によって異なる。上述のように、エンハンサー機能に重要な部分は第1 DNA断片及び第2 DNA断片に相当する配列部分であるので、当該配列部分の改変の程度は小さいことが好ましい。他方、その他の部分はエンハンサー機能に直接関与しないと予想されることから比較的大きな改変が許容され则认为られる。例えば、1～20個程度、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の塩基の置換、欠失、付加などを行うことができる。尚、このような改変には5'末端、3'末端、又はその他の部位への制限酵素切断配列の導入や、シグナルペプチドをコードする配列の付加などが含まれる。

【 0 0 1 8 】

本発明では、糸状菌で機能するプロモーターに第1 DNA断片及び第2 DNA断片（以下、これらのDNA断片及びこれらを含むDNA断片をまとめて、「エンハンサー機能を有するDNA断片」とも呼称する）が挿入されて改変プロモーターが構築されるが、これらのDNA断片の挿入部位は特に限定されない。但し、改変が施されるプロモーターとしてCCAAT配列及びSREを有するものを採用する場合には、これら二つの配列の間以外の部位に挿入することが好ましい。即ち、CCAAT配列よりも5'末端側の部位又はSREよりも3'末端側の部位にエンハンサー機能を有するDNA断片を挿入することが好ましい。

【 0 0 1 9 】

糸状菌で機能するプロモーターに複数個の第1 DNA断片及び複数個の第2 DNA断片を挿入することにより、本発明の改変プロモーターを作製することもできる。この場合、使用する第1 DNA断片と第2 DNA断片の個数を同じとすることが好ましい。また、一つの第1 DNA断片と一つの第2 DNA断片とが組をなし、かつ各組において第1 DNA断片が5' 末端側に位置するようにプロモーターに挿入されることが好ましい。

第1 DNA断片と第2 DNA断片を含むDNA断片を用いる場合においても、これを複数挿入してプロモーターの改変を行ってもよい。この場合においても、改変が施されるプロモーターとしてCCAAT配列及びSREを有するものを採用するときには、これら二つの配列の間以外の部位に当該DNA断片を挿入することが好ましい。

【 0 0 2 0 】

複数のエンハンサー機能を有するDNA断片を組込んでプロモーターの改変を行うことにより、更なるプロモーター活性の向上が期待できる。また、後述の実施例で示されるように（アミラーゼを産生させる際のカタボライト抑制を解除することに有効であることが示される）、プロモーター活性の抑制に働く機構をブロックないしは解除することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明における糸状菌で機能するプロモーターとしては、糸状菌で機能するという性質を有する限りその種類は特に限定されない。例えば、アスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属等の微生物におけるタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを挙げることができる。具体的には、アスペルギルス属の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターを用いることができる。中でも、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターを用いることが好ましい。これらのプロモーターはそれを有する微生物より、制限酵素処理、PCR法などの遺伝子工学的手法を用いて取得することができる。また、目的のプロモーターが組込まれたベクターを利用できる場合には、当該ベクターから制限酵素処理やPCR法などによって取得することができる。尚、本発明における糸状菌とは広義の糸状菌を意味し、酵母も包含する。

【 0 0 2 2 】

本発明は以上の改変プロモーターが組込まれたベクターも提供する。このようなベクターは目的とするタンパク質の生産に利用することができる。例えば、改変プロモーターの支配下に目的のタンパク質の構造遺伝子を導入して発現用ベクターを構築する。これを用いて適当な宿主を形質転換し、改変プロモーター及び目的のタンパク質の構造遺伝子が適切に導入された形質転換体を、当該タンパク質を産生可能な条件で培養する。その後、培養液又は菌体内より目的のタンパク質を回収する。尚、本発明でいう改変プロモーターが組込まれたベクターには、改変プロモーターの制御下に特定のタンパク質の構造遺伝子が組込まれたものも含まれる。

【 0 0 2 3 】

本発明のベクターは、宿主である糸状菌を形質転換した際に形質転換体を選択するのに好適な選択マーカーを有していることが好ましい。選択マーカーは使用する宿主との関係で適当なものを採用でき、例えばオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子 (argB)、硝酸還元酵素遺伝子 (niaD)、アセトアミダーゼ遺伝子 (amdS)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpC)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR) 等の栄養要求性相補遺伝子、オリゴマイシン、デストマイシン、ハイグロマイシン等に対する薬剤耐性遺伝子などを挙げることができる。

【 0 0 2 4 】

タンパク質の生産に利用される宿主としてはアスペルギルス属 (アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニドランス)、ペニシリウム属、トリコデルマ属、リゾプス属等に分類される糸状菌を用いることができる。好ましくはアスペルギルス属の糸状菌が用いられる。中でもアスペルギルス・オリゼ、又はニガーを用いることが安全性点から好ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明の改変プロモーターを利用して生産可能なタンパク質は特に限定されず、例えば α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ等の糖質関連酵素、キモシン等のプロテアーゼ、リパーゼなどを

挙げることができる。また、同種タンパク質、異種タンパク質の如何を問わない。尚、同種タンパク質とは、本発明の改変プロモーターが導入される糸状菌が本来的に産生するタンパク質を意味する。一方、異種タンパク質とは、本発明の改変プロモーターが導入される糸状菌が本来は産生しないタンパク質、即ち外来的にそれをコードする遺伝子が導入されることにより初めて産生されるタンパク質を意味する。

【 0 0 2 6 】

本発明のベクターの宿主への導入は公知の方法で行うことができる。例えば、プロトプラスト化した菌体を用いたTurnerら方法 (Gene, 36, 321-331(1985)) により行うことができる。その他、五味らの方法 (Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)) の方法などを採用してもよい。

【 0 0 2 7 】

本発明の改変プロモーター及び目的のタンパク質の構造遺伝子が適切に導入された形質転換体を、当該構造遺伝子を発現可能な条件で培養することにより、目的のタンパク質を産生させることができる。培養用の培地は使用する宿主に応じて適切なものが用いられる。例えば市販の各種培地又はこれらにアルギニン、ウリジン等の形質転換体の生育、選択、タンパク質の発現促進などに必要な成分を添加した培地などを用いることができる。

【 0 0 2 8 】

所望時間培養した後の培養液又は菌体より目的のタンパク質を回収することができる。即ち、分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液からの回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことにより、目的のタンパク質を取得することができる。他方菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

【 0 0 2 9 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。本実施例では、特に記載しない限り、制限酵素およびその他の遺伝子操作用酵素として宝酒造または東洋紡績の製品を用いた。尚、酵素の反応条件等は添付の取り扱い説明書に従った。

また、本実施例で使用した合成オリゴDNAは、宝酒造またはインビトロジェンで合成されたものを使用し、塩基配列の決定はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)、PCR反応はサーマル・サイクラー (パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて行った。

【 0 0 3 0 】

【実施例 1】 プロモーター領域のサブクローニング

アスペルギルス・オリゼJCM02239株のタカアミラーゼA遺伝子 (taaG2) 3164bp [Gene, 84, 319-327(1989)] を含むpTG-taa [Mol. Gen. Genet., 254, 119-126(1997)] を出発材料としてタカアミラーゼA遺伝子プロモーター領域およびタカアミラーゼA遺伝子のコーディング領域を調製した。

まず、pTG-taaからタカアミラーゼA(taaG2)プロモーター領域を含む750bpのEcoRI-SalI断片を取得し、この断片をプラスミドpKF18K (東洋紡績株式会社) のマルチクローニングサイトのEcoRI-SalI部位に挿入してタカアミラーゼプロモーターを含むプラスミドpKF-taaPを取得した。プロモーター領域への変異導入操作および改変プロモーター領域の構築はこのプラスミドを用いて行った。

【 0 0 3 1 】

【実施例 2】 転写制御因子結合配列を含むDNA断片の取得

既に報告されている広域転写活性化因子 (HAP) の結合因子であるCCAAT配列 [Mol. Gen. Genet., 237, 251-260(1993)] およびデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子 (AmyR) の結合因子SRE [Mol. Gen. Genet., 262, 668-676(1999)] を含む断片を次の様に取得した。

まず、CCAAT配列の5'末端側にXhoI部位を、3'末端側にNotI部位を付加した合成DNAとしてXNF (5'-CCGCTCGAGGCACCATCCAATTAGAAGCGCGCGCTAACTAT-3' : 配

列番号 1 3) と、この配列の相補鎖としてXNR (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCGCTTCTAAT TGGATGGTGCCTCGAGCGG-3' : 配列番号 1 4) を合成し、続いてこれら合成DNAの相補鎖同士を混合して98℃10分間加熱後、2時間かけて30℃まで冷却し、その後4℃まで冷却してアニーリングさせることによってCCAAT配列を単独で含むDNA断片を取得した。

【 0 0 3 2 】

一方、SREの5'末端側と3'末端側にSpeI部位およびHincII部位を付加した合成DNAとしてSREf (5'-GACTAGTTAACCTAGGGGCGGAAATTTAACGGGATGTTAAGTAGTC-3' : 配列番号 1 5) と、この配列の相補鎖としてSREr (5'-GACTAGTTAACATCCCGTTAAATTCCGCCCCTAGGTAACTAGTC-3' : 配列番号 1 6) を合成し、上記と同様の方法でSREを単独で含むDNA断片を取得した。以後、ここで作製したCCAAT配列のみを含むDNA断片を「CCAAT断片」、SREのみを含むDNA断片を「SRE断片」とそれぞれ呼ぶことにする。

【 0 0 3 3 】

次に、CCAAT配列からSREまでの領域を含むDNA断片 (配列番号 9。以下、「CCAAT-SRE断片」という) を、以下のプライマーおよび鋳型として実施例 1 で調製したpKF-taaPを用いて、94℃ 30秒、54℃ 30秒、72℃ 1分30秒を1サイクルとして30サイクルのPCR反応を行うことによって取得した。尚、PstIサイトを含有断片 (配列番号 1 0。以下、「CCAAT-SRE(PstI)断片」という) とXhoI-NotIサイトを含有断片 (配列番号 1 1。以下、「CCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片」という) の2種類を作製した。

【 0 0 3 4 】

PstIサイトを付加した上流プライマー、

CSPf: 5'-AAACTGCAGACCACCTCTAGGCATCGGACG-3' (配列番号 1 7)

PstIサイトを付加した下流プライマー、

CSPr: 5'-TTTCTGCAGTGTGATTGTTGTTGAGTGG-3' (配列番号 1 8)

XhoIサイトを付加した上流プライマー、

CSXf: 5'-CGGCTCGAGGCATCGGACGCACCATCC-3' (配列番号 1 9)

NotIサイトを付加した下流プライマー、

CSNr: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCGGACTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3' (配列番号 2 0)

【 0 0 3 5 】

[実施例 3] 改変プロモーターを含むプラスミドの構築

タカアミラーゼA遺伝子プロモーター領域への変異導入を次のように行った。
まず、実施例 1 で調製したpKF-taaPへプロモーター領域改変用の制限酵素サイトを導入するために、以下に示すプライマーおよびMutan-Super Express Km Kit (TAKARA社) を用いてpKF-taaPに対する部位特異的変異導入を行った。なお、野生型プロモーターの配列 (配列番号 1 2) を図 1 に示し、導入した制限酵素サイトの位置を図 2 に示した。

【 0 0 3 6 】

下流域 (配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 465) へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not-b: 5'-CGCTTGGATTCCCCGCCGCGGCCGCGCAGAGCTTAAAGTATGTCCC-3' (配列番号 2 1)

下流域 (配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 440) へのXhoIサイト導入用のプライマー、

Xho-b: 5'-GAATGCAATTTAAACTCTTCCTCGAGTCGCTTGGATTCCCCGCCC-3' (配列番号 2 2)

【 0 0 3 7 】

上流域 (配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 153) へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not-a: 5'-GTAGTAAAACCCCGGAGTCAGCGGCCGCCAAGCCCAAGTCCTTCACG-3' (配列番号 2 3)

上流域 (配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 128) へのXhoIサイト導入用のプライマー、

Xho-a: 5'-CGTCAAGGGATGCAAGACTCGAGTAGTAAAACCCCGGAGTC-3' (配列番号 2 4)

【 0 0 3 8 】

CCAAT配列とSREに挟まれた領域 (配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 252) へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not: 5'-GCACCATCCAATTAGAAGCGCGCGCGCGAAACAGCCCAAGAAAAAGG-3' (配列番号 25)

下流域(配列番号 12 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置490)へのSpeIサイト導入用のプライマー、

STATATA: 5'-TAAAGTATGTCACTAGTCGATGCGAT-3' (配列番号 26)

【0039】

次に、実施例2で調製したCCAAT断片をXhoIおよびNotIで切断し、アガロースゲル電気泳動に供して回収・精製した。得られたDNA断片を上記のようにしてプロモーター下流域に導入したXhoI-NotI部位に挿入し、改変プロモーターPCCAATbを含むプラスミドpKF-CCAATbを作製した。同様に、実施例2で調製したSRE断片をHincIIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入された改変プロモーターPSREbを含むプラスミドpKF-SREb、実施例2で調製したCCAAT-SRE(PstI)断片をPstIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のPstI部位に挿入された改変プロモーターPCSPを含むプラスミドpKF-PCSP、実施例2で調製したCCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片をXhoI、NotIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入された改変プロモーターPCSBを含むプラスミドpKF-PCSBをそれぞれ作製した。また、CCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片をXhoI、NotIで切断し、回収・精製した断片をプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入し、その後、CCAAT-SRE(PstI)断片をPstI部位に挿入することにより、2箇所CCAAT-SRE断片が挿入された改変プロモーターPCSPbを含むプラスミドpKF-PCSPbを作製した。

【0040】

[実施例4] プロモーター活性評価用プラスミドの構築

プロモーター活性評価用プラスミドの作製過程を図3に示す。まず、プラスミドpUC18(東洋紡績株式会社)をSalIで消化後、Klenow処理によって平滑末端化し、セルフライゲーションすることによってSalI部位の欠失したプラスミドpUC18(S-)を取得した。一方、プラスミドpTG-taaよりタカアミラーゼA遺伝子のEcoRI断片を単離し、この断片をpUC18(S-)のマルチクローニングサイトのEcoRI部位に挿入してpUC-taa(S-)を取得した。このプラスミドpUC-taa(S-)をEcoRIで部分分

解し、*taaG2*遺伝子の3'末端側のEcoRIサイトが欠失したプラスミドpUC-*taa*を取得した。同様に、pBluescriptII KS(+)のXhoI、SalI、BamHIを欠失させたプラスミドpBlue(XSE-)を取得した。

【 0 0 4 1 】

次に、pUC-*taa*から*taaG2*を含むEcoRI-HindIII断片を単離して、この断片をプラスミドpBlue(XSE-)のマルチクロニングサイトのEcoRI-HindIII部位に挿入して、*taaG2*を含むプラスミドpBlue-*taa*を取得した。

続いて、実施例3で得られた改変プロモーターを含むプラスミドpKF-*taa*PMシリーズ (pKF-CCAATb、pKF-SREb、pKF-PCSP、pKF-PCsb、またはpKF-PCSPb) から改変プロモーター領域のEcoRI-SalI断片を単離して、プラスミドpBlue-*taa*のマルチクロニングサイトのEcoRI-SalIに挿入し、改変プロモーター領域と*taaG2*遺伝子が連結したプラスミドpBlue-*taaM*を取得した。pBlue-*taaM*から改変プロモーターを含んだ*taaG2*遺伝子のXbaI-BamHI断片を単離し、プラスミドpBAR7 (pBluescriptII KS(+)にアスペルギルス・ニドランス由来のC末が欠失した*argB*遺伝子が挿入されたプラスミド) のマルチクロニングサイトのXbaI-BamHIに組み込み、プロモーター活性測定用プラスミドpBAR-*taaM*シリーズ (pBAR-CCAATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCsb、及びpBAR-PCSPb) とした。

【 0 0 4 2 】

[実施例5] 改変プロモーターを有する形質転換体の取得

5-1 形質転換

糸状菌の形質転換を次のように行った。まず、実施例4で得られたpBAR-*taaM*シリーズ (pBAR-CCAATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCsb、及びpBAR-PCSPb) の各プラスミドをEcoRVで消化後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の操作を行い、精製したものを形質転換に用いた。

次に、これらのプラスミドによるアスペルギルス・ニドランスの形質転換を行った。アスペルギルス・ニドランスのオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子欠損株であるABPU1株 (*bia1*; *pyrG89*; *wa3*; *argB2*; *pyroA4*) をコンブリート培地 (2% マルトエキス、2% グルコース、0.1% バクトペプトン) に必要な栄養源 (アルギニン、ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した

培地で、37℃、一晚振とう培養した後、得られた菌体を細胞壁溶解液〔20 mg/ml Yatalase（宝酒造社）、0.8 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液（pH6.0）〕に懸濁し、30℃で1～2時間緩やかに振とうすることによりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストをナイロンフィルターで濾過することにより、残存する菌体を除去した。次にこのプロトプラストを用いて、Turnerらの方法〔Gene, 36, 321-331(1985)〕によりコンピテントセルの調製および形質転換を行い、アルギニンを含まない培地（ツアベック・ドックス培地（0.2% NaNO_3 、0.1% K_2HPO_4 、0.05% KCl 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2% グルコース（pH5.5））にウリジン、ピリドキシン、及びビオチンを添加した培地）で生育可能な形質転換体をそれぞれのプラスミドにつき、20から40株ずつ取得した。

【0043】

5-2 サザンブロット解析による形質転換体の選択

各形質転換株から染色体DNAを次のように調製した。まず、形質転換株をコンブリート培地に必要な栄養源（ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した培地で37℃、一晚振とう培養後、得られた菌体をブフナー漏斗とNo.2のろ紙（アドバンテック社）で集めて滅菌水で洗浄した。余分な水分を除去したあと、-80℃で凍結し、FREEZONE（LABCONCO社）を用いて凍結乾燥した。乾燥後、1mmのガラス玉を加えて、マルチピーズショッカー（安井器械社）を用いて2000rpm、5分間破碎して微粉末状にし、この菌体破碎物に抽出溶液〔1% ヘキサデシルメチルアンモニウムブロマイド、0.7M NaCl、50mM Tris-HCl、10mM EDTA、1% β -メルカプトエタノール〕を加えて攪拌後、室温で30分間放置した。得られた溶菌液をフェノール/クロロホルム抽出して、夾雑するタンパク質を除去後、等量のイソプロパノールを加えて、DNAを沈殿させた。この沈殿物を0.1mg/mlのRNaseを含むTE溶液に溶解して、37℃、30分間反応させた後、さらに0.2mg/mlのproteinase Kを含むTE溶液を加え、37℃、30分間反応させた。この溶液をフェノール/クロロホルム抽出した後、2.5倍容の冷エタノールで沈殿させた。この沈殿物を70% エタノールでリンスして乾燥後、TE溶液に溶解したものを染色体DNA溶液とした。

【0044】

サザンブロット解析は、染色体DNAをPvuIIあるいはEcoRVで消化後、アガロー

スゲル電気泳動で分離してナイロンメンブレン（ロシュ社）にブロットした後、taaG2の約1000bpのBglIII-SmaI消化物をプローブとして検出した。このとき、プローブのラベリングおよびシグナルの検出はDIG核酸検出キット（ロシュ社）を用いて行った。

【0045】

サザン解析の結果よりプロモーター活性の測定に適した形質転換体、即ちプラスミドがargB座位へ相同的に1コピー組み込まれた株で、染色体に組み込まれるときの位置による影響と、導入される遺伝子のコピー数の影響を受けずにプロモーター活性を測定できる形質転換体を、使用したプラスミドにつき、任意に2株以上選択した。

【0046】

[実施例6] 形質転換体のアミラーゼ活性測定及び改変プロモーターの活性評価

実施例5で得られた、pBAR-CCAATb又はpBAR-SREbが組み込まれた各形質転換体を用いて、CCAAT配列又はSREを単独で挿入して改変を行った場合のプロモーター活性の変化を評価した。また、pBAR-PCSPが組み込まれた形質転換体を用いて、CCAAT配列及びSREを同時に挿入して改変を行った場合についても同様に評価した。まず、各形質転換体を、最少培地（0.9% NaNO_3 、0.05% KCl 、0.15% KH_2PO_4 、0.15% Trace element、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% グルコース（pH6.5））に必要な栄養源（ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した寒天培地に放射状に植菌し、37℃、3日間培養した後、この寒天培地から分生胞子を孢子懸濁用溶液（0.01% tween80、0.8% NaCl ）に懸濁して綿で濾過し、孢子懸濁液を調製した。この孢子懸濁液から、分生胞子 1×10^8 個をSP培地（1% Starch、1% polypeptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （pH6.5））にアルギニン以外の必要な栄養源（ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した培地100mlに接種し、37℃、36時間振とう培養後、ブフナー漏斗とろ紙で菌体と上清を分離して、上清を酵素溶液とした。

【0047】

アミラーゼ活性は20mM 酢酸ナトリウムbuffer、10mM CaCl_2 、2% Soluble Starch（ナカライテスク社）、に酵素溶液を加えて150 μl の反応系を調製し、これを

37℃で20分間反応させて生成した還元糖量をNelson-Somogyi法により定量した。また、1分間に1 μ molのグルコースを遊離する酵素量を1unitとした。以上のように測定したアミラーゼ活性を指標として、野生型プロモーターと改変プロモーターとのプロモーター活性の評価を行った。

【0048】

アミラーゼ活性の測定結果を図4の表に示す。この表からわかるように、CCAAT配列あるいはSREを挿入した改変プロモーター（PCCAATb及びPSREb）は、野生型プロモーター（taaP）と比較すると活性が低下しているか、あるいはほとんど差がなく、CCAAT配列やSREを単独で挿入することによるプロモーター活性の上昇効果は認められなかった。また、これらの断片をそれぞれ複数挿入した場合にも同様に活性の上昇効果は認められなかった（データ示さず）。これらの結果から、本プロモーターはすでに高度に最適化されており、CCAAT配列やSREの挿入効果よりも変異導入によるプロモーター構造への悪影響のほうが顕著に現れたものと考えられた。

他方、CCAAT配列及びSREが同時に挿入された改変プロモーター（PCSP）では、野生型プロモーター（taaP）と比較して著しい活性の上昇が見られ、約4倍のアミラーゼ活性が認められた。以上の結果より、プロモーター活性を上げるにはCCAAT配列とSREを同時に挿入することが重要であるといえる。

【0049】

【実施例7】 CCAAT配列及びSREを複数挿入してプロモーターの改変を行った場合の効果

次に、CCAAT-SRE断片をプロモーター領域に複数挿入した場合のプロモーター活性への効果を検討するため、実施例5で得られたpBAR-PCSPb（プロモーター領域にCCAAT-SRE断片が二つ挿入されている）が組み込まれた形質転換体を用いて、実施例6と同様の方法でアミラーゼ活性を測定した。比較として、CCAAT-SRE断片を一つ挿入して改変を行ったプロモーターを有するプラスミドpBAR-PCSPb又はpBAR-PCSPが組み込まれた形質転換体のアミラーゼ活性を測定した。

【0050】

測定結果を図5の表（デンプンの欄）に示す。尚、図5の上段には、各改変プ

ロモーターにおけるCCAAT配列又はSREの挿入位置が模式的に表される。この表からわかるように、CCAAT配列からSREを含む領域を1つ挿入したPCSBやPCSPと、2つ挿入したPCSPbは共に野生型プロモーター（taaP）の約4倍の発現量である。即ち、デンプンをC源とした場合では、CCAAT-SRE断片を複数挿入することによる相乗効果は認められなかった。このことから、デンプンをC源とする場合には、CCAAT-SRE断片を1個挿入するだけで十分な発現量増加効果が得られることが確認できた。

【 0 0 5 1 】

[実施例 8] 改変プロモーターの炭素源に対する効果

CCAAT-SRE断片を1個あるいは2個挿入した改変プロモーターPCSB、PCSPおよびPCSPbのグルコースに対する有効性を検討するために、pBAR-PCSBが組み込まれた形質転換体、pBAR-PCSPが組み込まれた形質転換体、及びpBAR-PCSPbが組み込まれた形質転換体をC源がグルコースであるGP培地（1% Glucose、1% polypeptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH6.5)) で培養した場合のアミラーゼ活性を測定し、C源がスターチであるSP培地（1% Starch、1% polypeptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH6.5)) で培養した場合の各アミラーゼ活性（実施例 7）と比較した。C源をグルコースにした場合の測定結果を図 5 の表（グルコースの欄）に示す。この結果より、C源をグルコースにした場合は、CCAAT-SRE断片が一つ挿入されたPCSB、PCSPと比較してCCAAT-SRE断片が二つ挿入されたPCSPbのアミラーゼ活性は非常に高く（野生型の40倍以上）、グルコースによる抑制の程度が低くなることがわかる。このことから、CCAAT-SRE断片をプロモーター領域に複数挿入することによって、発現増強効果に加えてカタボライト抑制を解除ないしは弱める効果が得られることが示された。

【 0 0 5 2 】

[実施例 9] エンハンサー機能を有するDNA断片の多様性の検討

CCAAT-SRE断片のSRE部分の一部を変化させた場合にプロモーター活性の増強効果が保持されるかどうかを検討した。まず、SRE部分が野生型（CGGAATTTAAAGG：配列番号 6）から（CGGAATTTAAACGG：配列番号 7）に置換されるように設計し

た以下のプライマー-MSRE、及びMutan-Super Express Km Kit (TAKARA社) を用いてpKF-taaPに対する部位特異的変異導入を行った。変異が導入されたプロモーター領域からCCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片を取得し、これをCCAAT-mSRE断片とした。次に、実施例2及び3と同様の方法で、CCAAT-mSRE断片をプロモーター下流域のXhoI-NotIサイトに挿入した改変プロモーターPCmSbを作製し、この改変プロモーターを含むプラスミドpKF-PCmSbを用いて、実施例4と同様の方法でアミラーゼ活性測定用プラスミドpBAR-PCmSbを構築し、次いで実施例5及び6と同様の方法でプロモーター活性を評価した。

【 0 0 5 3 】

SRE部分の一部を他の塩基に置換するためのプライマー、

MSRE: 5'-TAGGGGCGGAATTTAAACGGGATTAA-3' (配列番号27)

アミラーゼ活性の測定結果を図6の表に示す。この表からわかるように、塩基置換を施したプロモーター(PCmSb)では野生型(taaP)の約3.2倍のアミラーゼ発現量が見られ、SREに塩基置換を施さないプロモーター(PCsB)と同等のプロモーター活性増強効果が認められた。このことから、SRE部分の配列の一部に変異を施してもプロモーター活性を増加する効果、即ちエンハンサー機能を保持できることが確認できた。

【 0 0 5 4 】

[実施例10] エンハンサー配列の挿入位置の検討

CCAAT-SRE断片を様々な部位に挿入してプロモーターを改変した場合のプロモーター活性への影響を比較し、効果的な挿入位置を検討した。

まず、実施例3と同様の方法によって、実施例9で作製したCCAAT-mSRE断片がプロモーター上流域のXhoI-NotIサイト、CCAAT配列とSREに挟まれた領域のNotIサイト、又は下流域のSpeIサイトに挿入された改変プロモーターPCmSa、PCmSN、PCmSSをそれぞれ作製した。そして、実施例3及び4と同様の方法で、これらの改変プロモーターを含むアミラーゼ活性測定用プラスミドを構築し、次いで実施例5及び6と同様の方法でプロモーター活性を比較した。

【 0 0 5 5 】

アミラーゼ活性の測定結果を図6の表に示す。尚、表の左には各改変プロモ-

ターにおけるCCAAT-mSRE断片の挿入位置が模式的に表される。この表からわかるように、CCAAT配列からSREを含む領域を、もともと存在するCCAAT配列とSREの間に挿入した改変プロモーターPCmSNではプロモーター活性の上昇は認められなかったが、CCAAT配列とSREの間以外の領域に挿入した場合には、どの領域に挿入してもアミラーゼ発現量が増加することが認められた。しかし、CCAAT配列より上流やTATA-boxの直前に挿入した改変プロモーターPCmSaやPCmSSよりも、プロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入したPCmSb（実施例9）の方が発現量が多かった。このことから、CCAAT-mSRE断片の挿入位置はもともと存在するSREの下流側が最も適しており、また転写開始点からCCAAT-mSRE断片までの距離とプロモーター活性とは相関性がないことが示唆された。尚、CCAAT-SRE断片についても同様であると考えられる。

【 0 0 5 6 】

[実施例 1 1] アミラーゼ高生産株の取得

改変プロモーターを持つアミラーゼ遺伝子を用いてアスペルギルス・ニドランスのアミラーゼ高生産株の取得を試みた。

実施例5又は7で作製した形質転換体の中から改変プロモーターを有するアミラーゼ遺伝子がargB座位へ相同的に多コピー組み込まれた株（CSb16、CSP6、CSPb19）を選択して、100mlのSPY培地（3% Starch、0.2% KCl、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% polypeptone、0.5% Yeast Extract）で37℃、5日間培養して実施例6で示した方法によりアミラーゼ活性を測定した。その結果を図7の表に示す。野生型プロモーターを持つtaa2株と比較して、改変プロモーターを持つCSb17株は5倍のアミラーゼ発現量を示した。アミラーゼ遺伝子が多コピー組み込まれた株では、コピー数の増加に伴って発現量が増加する傾向にあり、最も発現量が高い株で野生型プロモーターの約34倍、タンパク質量として1リットルあたり約10gものアミラーゼを発現していた。このことから、改変したプロモーターを持つアミラーゼ遺伝子を多コピー組み込むことにより、大量のタンパク質生産が可能であることが確認できた。

【 0 0 5 7 】

[実施例 1 2] 炭素源の違いによるアミラーゼ生産性の比較

次に、プロモーター領域にCCAAT-SRE断片を2つ有するCSP6株と、プロモーター領域にCCAAT-SRE断片を3つ有するCSPb19株を用いて様々なC源に対する発現量の差を調べた。

CSP6株とCSPb19株を100mlのSPY培地（C源デンプン：3% Starch、0.2% KCl、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% polypeptone、0.5% Yeast Extract）とMPY培地（C源マルトース：3% Maltose、0.2% KCl、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% polypeptone、0.5% Yeast Extract）、およびGPY培地（C源グルコース：3% Glucose、0.2% KCl、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% polypeptone、0.5% Yeast Extract）で37℃、5日間培養して実施例6と同様の方法でアミラーゼ活性を測定した。

【0058】

その結果を図8の表に示す。この表からわかるように、どちらの株もデンプンをC源として培養したときよりもマルトースをC源として培養したときの方がアミラーゼ活性が低い。これは低分子のC源を用いたことによるC源枯渇等の影響であると思われる。また、グルコースをC源とした場合にCSP6株はカタボライト抑制を受けて発現量が著しく低下してしまうのに対し、CSPb19株はデンプンをC源にした場合とほぼ同等の発現量を維持していた。これは、5日間という長時間の培養においても、CCAAT-SRE断片を3つ以上プロモーター領域に有することにより、カタボライト抑制を解除できたことを反映したものと考えられる。このことから、CCAAT-SRE断片を多く挿入して改変を行ったプロモーターを用いることにより、長時間の培養においてもカタボライト抑制を効果的に解除でき、効率的なアミラーゼの生産を行えることが確認された。

【0059】

[実施例13] CCAATとSREとの距離を変化させた場合の効果

CCAAT-SRE断片においてCCAAT配列とSREとの距離を変化させた場合のエンハンサー機能への影響を検討した。

まず、実施例2に示したプライマーCSXf、CSNrと次に示すプライマーCBglr、SBglfを用いてPCR反応を行い、CCAAT配列を含む断片とSREを含む断片とを別々に取得した。これらの断片をBgIIIサイトで連結することにより、CCAAT配列とSRE

との距離が短いDNA断片（以下、「sCCAAT-mSRE断片」という）を取得し、プロモーター（taaP）領域内の下流域のXhoI-NotIサイトに挿入して改変プロモーターPsCmSbを作製した。この改変プロモーターを用いて、実施例3から6と同様の方法によりプロモーター活性を評価した。

【0060】

BglIIサイトを付加した下流プライマー

CBglr : 5'-GAAGATCTCTGTTTCGCTTTGCTGCTTC-3'（配列番号28）

BglIIサイトを付加した上流プライマー

SBglf : 5'-GAAGATCTTCCAGAGTGACTAGGGGCGG-3'（配列番号29）

【0061】

アミラーゼ活性を測定した結果を図9の表に示す。この表に示されるように、sCCAAT-SRE断片を用いて改変を行ったプロモーター（PsCmSb）は野生型プロモーター（taaP）の約1.6倍のアミラーゼ発現量の増加効果が認められる。即ち、CCAAT配列とSREの間を短くした場合にもプロモーター活性の増強効果が得られている。このことから、プロモーターの活性化に関与しているのはCCAAT配列とSREの2つの領域であることが強く示唆される。尚、PsCmSbは、元の大きさのCCAAT-mSRE領域を挿入したPCmSbと比較すると約半分の増加効果しかないが、この増加効果の低下はCCAAT配列からSREまでの距離を変えたことにより、CCAAT配列に結合するHAP複合体とSREに結合するAmyRと位置関係が最適な位置からずれたためではないかと思われる。つまり、CCAAT配列からSREまでの距離の最適化により、より短いDNA断片を用いた場合でもCCAAT-SRE断片が有するプロモーター活性の増強効果を保持することは十分に可能であると考えられる。

【0062】

[実施例14] エンハンサー配列（SRE）の多様性の検討

野生型プロモーター（taaP）のSRE部分に種々の変異を導入した場合のプロモーター活性への影響を調べた。まず、以下に示すプライマーを用いたPCR反応によって、野生型プロモーター（taaP）に存在するSREの一部の塩基を他の塩基に置換した改変プロモーターtaaS（SRE部分の配列がCGGAAATTAAACGG：配列番号8）とMSRE2（SRE部分の配列がCGGAAATTAAATTA：配列番号30）を作製した。これ

らの改変プロモーターを用いて、実施例 3 から 6 と同様の方法によりプロモーター活性を評価した。

【 0 0 6 3 】

SREc (taaS用) : 5'-GGGGCGGAAATTTAACGGGATTAATTTCC-3' (配列番号 3 1)

MSRE2 (MSRE2用) : 5'-CGGAAATTTAATTAGATTAATTTCC-3' (配列番号 3 2)

【 0 0 6 4 】

アミラーゼ活性を測定した結果を図 1 0 の表に示す。野生型のプロモーターに存在する SRE の 5' 末端側から 12 番目の塩基を C に変異させた改変プロモーター taaS は、野生型プロモーターの約 1.2 倍のアミラーゼ活性が認められる。この結果から、SRE の 5' 末端側から 12 番目の塩基を変異させたとしても、SRE が有するエンハンサー機能を維持できること、及びこの塩基を C に置換して得られる配列はより優れたエンハンサー機能を有することが判明した。一方、SRE 部分の 5' 末端側から 13 及び 14 番目の塩基をそれぞれ T 及び A に置換した改変プロモーター MSRE2 ではアミラーゼ発現量が低下し、野生型プロモーターの約 0.8 倍になった。この結果から、SRE の 5' 末端側から 13、14 番目の塩基については変異させないことが高いエンハンサー機能を維持するのに重要であるといえる。

【 0 0 6 5 】

【発明の効果】

本発明により、糸状菌で機能する発現効率の高い改変プロモーターが提供される。この改変プロモーターを用いれば、糸状菌を宿主とした同種又は異種タンパク質の効率的な生産系が構築できる。アミラーゼを生産タンパク質のモデルとして検討したところ、野生型プロモーターを用いた場合に比較して 34 倍もの発現量を有する形質転換体を取得され、本発明の改変プロモーターがタンパク質の高生産系の構築に極めて有用であることが確認された。

【 0 0 6 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AMANO ENZYME INC.

<120> Modified promoter

<130> promoter

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 1

ccaatnnnnn n 11

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 2

cggnnnnnnn nngg 14

<210> 3

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 3

ccaattagaa g 11

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 4

cgghnwwwwn whgg 14

<210> 5

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 5

cggwwwwww whgg 14

<210> 6

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 6

cggaattta aagg 14

<210> 7

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 7

cggaatttaa acgg 14

<210> 8

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 8

cggaattta acgg 14

<210> 9

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment
including CCAAT sequence and SRE

<400> 9

ccaattagaa gcagcaaagc gaaacagccc aagaaaaagg tcggcccgtc ggccttttct 60
gcaacgctga tcacgggcag cgatccaacc aacaccctcc agagtgacta ggggcggaaa 120
tttaaagg 128

<210> 10

<211> 196

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment
including CCAAT sequence and SRE

<400> 10

ctgcagacca cctctaggca tcggacgcac catccaatta gaagcagcaa agcgaaacag 60
cccaagaaaa aggtcggccc gtcggccttt tctgcaacgc tgatcacggg cagcgatcca 120
accaacaccc tccagagtga ctaggggcgg aaatttaaag ggattaattt ccactcaacc 180
acaaatcaca ctgcag 196

<210> 11

<211> 193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment

including CCAAT sequence and SRE

<400> 11

ctcgagaggc atcggacgca ccatccaatt agaagcagca aagcgaaaca gccaagaaa 60
aaggtcggcc cgtcggcctt ttctgcaacg ctgatcacgg gcagcgatcc aaccaacacc 120
ctccagagtg actaggggcg gaaatttaaa gggattaatt tccactcaac cacaatcac 180
agtcggcggc cgc 193

<210> 12

<211> 615

<212> DNA

<213> *Aspergillus oryzae*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(615)

<400> 12

gaattcatgg tgttttgatc attttaaatt tttatatggc ggggtggtggg caactcgctt 60
ccgggcaact cgcttaccga ttacgttagg gctgatattt acgtaaaaat cgtcaaggga 120
tgcaagacca aagtagtaaa accccggagt caacagcatc caagcccaag tccttcacgg 180
agaaaccca gcgtccacat cacgagcgaa ggaccacctc taggcatcgg acgcaccatc 240
caattagaag cagcaaagcg aaacagccca agaaaaaggt cggcccgtcg gccttttctg 300
caacgctgat cacgggcagc gatccaacca acaccctcca gagtgactag gggcggaaat 360
ttaagggat taatttccac tcaaccacaa atcacagtcg tccccggtat tgtcctgcag 420
aatgcaattt aaactcttct gcgaatcgct tggattcccc gcccttgcc gtagagctta 480
aagtatgtcc cttgtcgatg cgatgtatca caacatataa atactagcaa gggatgccat 540
gcttgaggga tagcaaccga caacatcaca tcaagctctc ctttctctga acaataaacc 600
ccacagaagg cattt 615

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 13

ccgctcgagg caccatccaa ttagaagcgc ggccgctaaa ctat 44

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 14

atagtttagc ggccgcgctt ctaattggat ggtgcctcga gcgg 44

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying SRE

<400> 15

gactagttaa cctaggggcg gaaatttaac gggatgttaa ctagtc 46

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying SRE

<400> 16

gactagttaa catcccgtaa aatttccgcc cctaggtaa ctagtc 46

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 17

aaactgcaga ccacctctag gcatcggacg 30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 18

tttctgcagt gttgatttgt ggttgagtgg 30

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 19

cggctcgagg catcgacgc accatcc 27

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 20

atagtttagc ggccgccgac tgtgatttgt ggttgagtgg 40

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 21

cgcttgatt ccccgccgc gccgcagag cttaaagtat gtccc 45

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 22

gaatgcaatt taaactcttc ctcgagtcgc ttggattccc cgccc 45

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 23

gtagtaaac cccggagtca gcggccgcca agcccaagtc cttcacg 47

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 24

cgtcaaggga tgcaagactc gagtagtaaa accccggagt c 41

<210> 25

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 25

gcaccatcca attagaagcg cggccgcgaa acagcccaag aaaaagg 47

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 26

taaagtatgt cactagtcga tgcgat 26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 27

taggggcgga atttaaacgg gattaa 26

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAATsequence

<400> 28

gaagatctct gtttcgcttt gctgcttc 28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
SRE

<400> 29

gaagatcttc cagagtgact aggggcgg 28

<210> 30

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a partially
modified SRE

<400> 30

cggaattta atta 14

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a PCR primer
designed for mutating SRE

<400> 31

ggggcggaaa tttaacggga ttaatttc 29

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a PCR primer
designed for mutating SRE

<400> 32

cggaattta attagattaa ttcc 25

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 はタカアミラーゼ A 遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の配列を示す図である。

【図 2】 図 2 はタカアミラーゼ A 遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の模式図であり、転写制御因子結合配列（CCAAT 配列・SRE）の位置と、変異導入箇所を示す。部位特異的変異によって導入した制限酵素サイトを下線で示す。CCAAT は CCAAT 配列（広域転写活性化因子（HAP 複合体）の結合因子）、SRE はデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子（AmyR）の結合因子、TATA は TATA-box、+1 は転写開始点をそれぞれ表す。

【図 3】 図 3 は実施例 4 におけるプロモーター活性評価用プラスミドの作製過程を示す図である。

【図 4】 図 4 は実施例 6 におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表の左には各改変プロモーターにおける CCAAT 配列又は SRE の挿入位置が模式的に表される。点線で囲った部分が挿入した断片である。taaP は野生型プロモーター、PCCAATb は CCAAT 配列を挿入した改変プロモーター、PSREb は SRE を挿入した改変プロモーター、PCSP は CCAAT-SRE 断片を挿入した改変プロモーターをそれぞれ表す。

【図 5】 図 5 は実施例 7 及び 8 におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。上段には各改変プロモーターにおける CCAAT-SRE 断片の挿入位置が模式的に表される。点線で囲った部分が挿入した断片である。taaP は野生型プロモーター、PCsb 及び PCSP は CCAAT-SRE 断片を一つ挿入した改変プロモーター、PCSPb は CCAAT-SRE 断片を二つ挿入した改変プロモーターをそれぞれ表す。

【図 6】 図 6 は実施例 10 におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表の左には各改変プロモーターにおける CCAAT-mSRE 断片の挿入位置が模式的に表される。点線で囲った部分が挿入した断片である。taaP は野生型プロモーターを表す。また、PCmSa、PCmSN、PCmSb、PCmSS はそれぞれ異なる位置に CCAAT-mSRE 断片を一つ挿入した改変プロモーターを表す。

【図 7】 図 7 は実施例 11 で取得した各形質転換体を SPY 培地で 5 日間培養した場合のアミラーゼ生産量をまとめた表である。ABPU1 は使用した宿主、taa2 は

野生型プロモーターを有する菌株を表す。アミラーゼ生産量はタカアミラーゼの比活性を100 U/mgとしたときの換算値で示した。

【図8】 図8は実施例12におけるアミラーゼ生産量の測定結果をまとめた表であり、改変プロモーターを有する菌体を様々な炭素源で5日間培養した場合のアミラーゼ生産量が示される。アミラーゼ生産量はタカアミラーゼの比活性を100 U/mgとしたときの換算値で示した。

【図9】 図9は実施例13におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表の左には各改変プロモーターにおけるCCAAT-mSRE断片又はsCCAAT-mSRE断片の挿入位置が模式的に表される。点線で囲った部分が挿入した断片である。taaPは野生型プロモーター、PCmSbはCCAAT-mSRE断片を挿入した改変プロモーター、PsCmSbはsCCAAT-mSRE断片を挿入した改変プロモーターをそれぞれ表す。

【図10】 図10は実施例14におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表の左には各改変プロモーターにおけるSRE部分の配列が示される。taaPは野生型プロモーターを表す。taaSでは5'末端側から数えて12番目の塩基が置換されている。同様にMSRE2では5'末端側から数えて12～14番目の塩基が置換されている。

【書類名】

図面

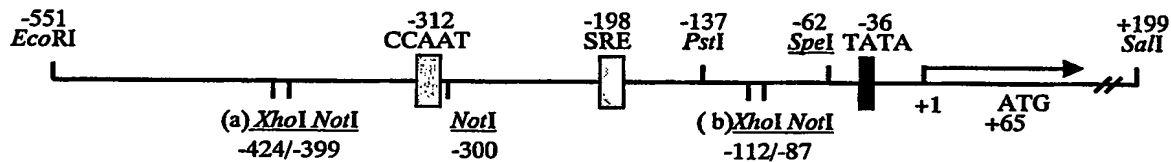
【図 1】

```

1 GAATTCATGG TGTTTTGATC ATTTTAAATT TTTATATGGC GGGTGGTGGG CAACTCGCTT 60
60 CCGGGCAACT CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACGTAAAAAT CGTCAAGGGA 120
121 TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAGT CAACAGCATC CAAGCCCAAG TCCTTCACGG 180
181 AGAAACCCCA GCGTCCACAT CACGAGCGAA GGACCACCTC TAGGCATCGG ACGCACCATC 240
241 CAATTAGAAG CAGCAAAGCG AAACAGCCCA AGAAAAAGGT CGGCCCGTCG GCCTTTTCTG 300
301 CAACGCTGAT CACGGGCAGC GATCCAACCA ACACCCTCCA GAGTGACTAG GGGCGGAAAT 360
361 TTAAAGGGAT TAATTTCCAC TCAACCACAA ATCACAGTCG TCCCCGGTAT TGTCCTGCAG 420
421 AATGCAATTT AAACCTCTCT GCGAATCGCT TGGATTCCCC GCCCCTGGCC GTAGAGCTTA 480
481 AAGTATGTCC CTTGTTCGATG CGATGTATCA CAACATATAA ATACTAGCAA GGGATGCCAT 540
541 GCTTGGAGGA TAGCAACCGA CAACATCACA TCAAGCTCTC CCTTCTCTGA ACAATAAACC 600
601 CCACAGAAGG CATT
615

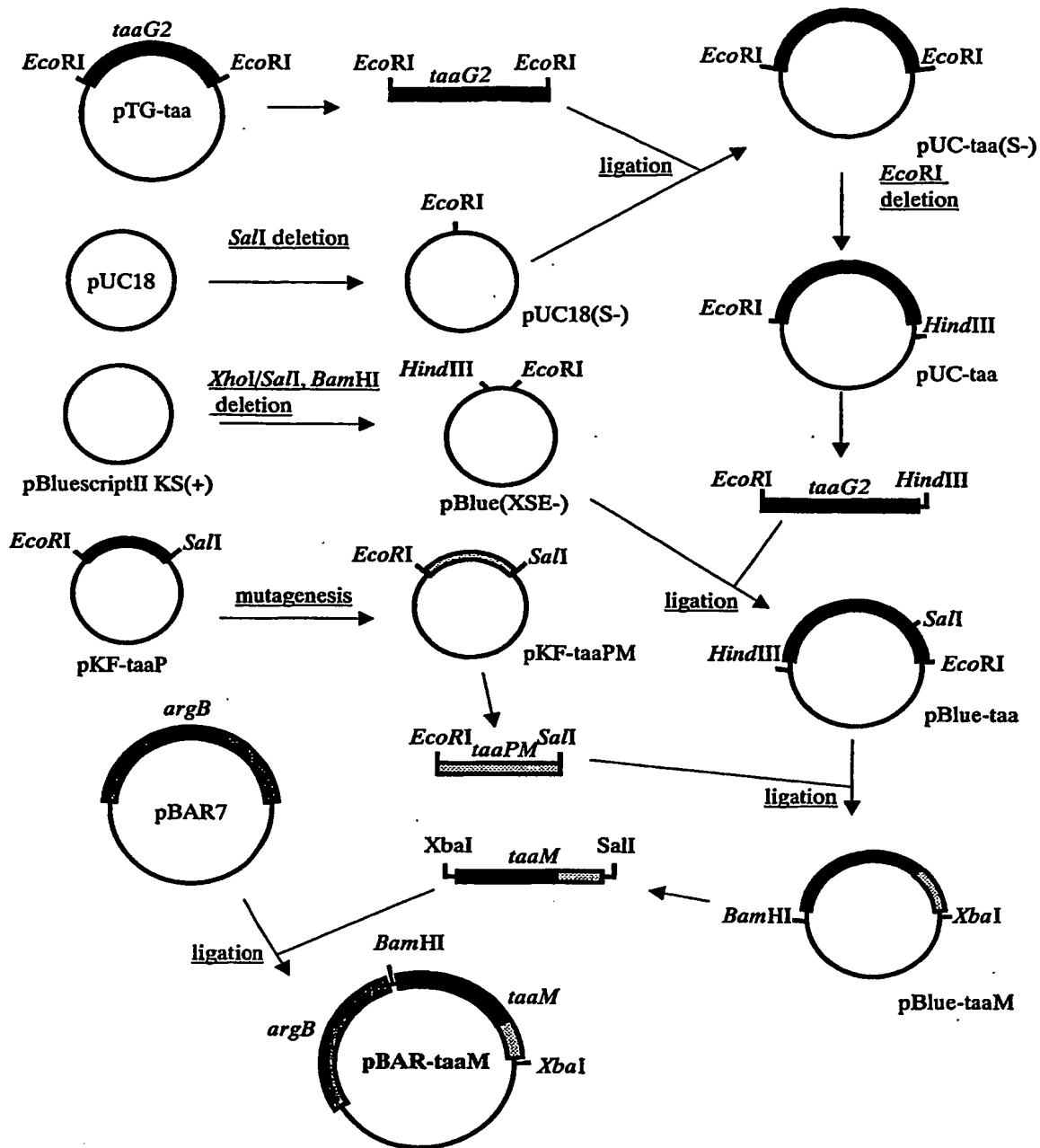
```

【図 2】



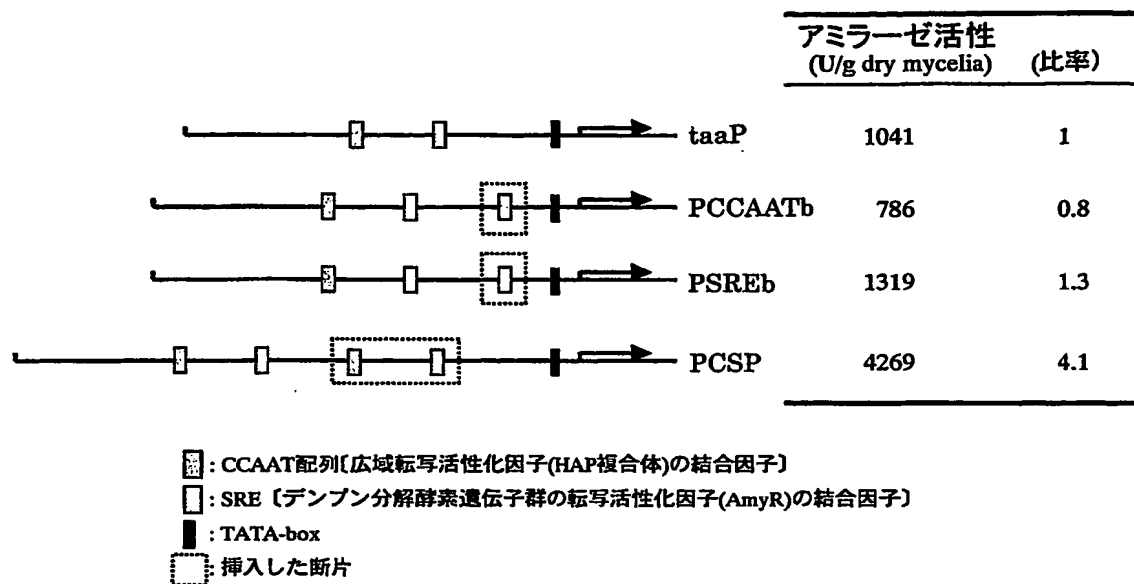
- [] : CCAAT配列[広域転写活性化因子(HAP複合体)の結合因子]
 [] : SRE [デンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子(AmyR)の結合因子]
 [] : TATA-box
 +1: 転写開始点

【図 3】

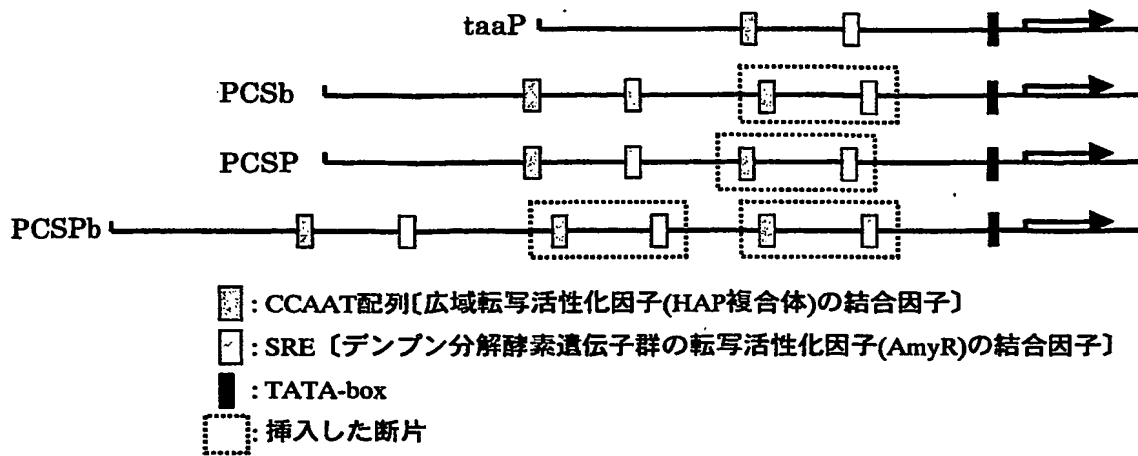


taaG2 : タカアミラーゼA遺伝子
 argB : オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(選択マーカー)
 taaM : 改変プロモーターを含んだタカアミラーゼ遺伝子

【図 4】

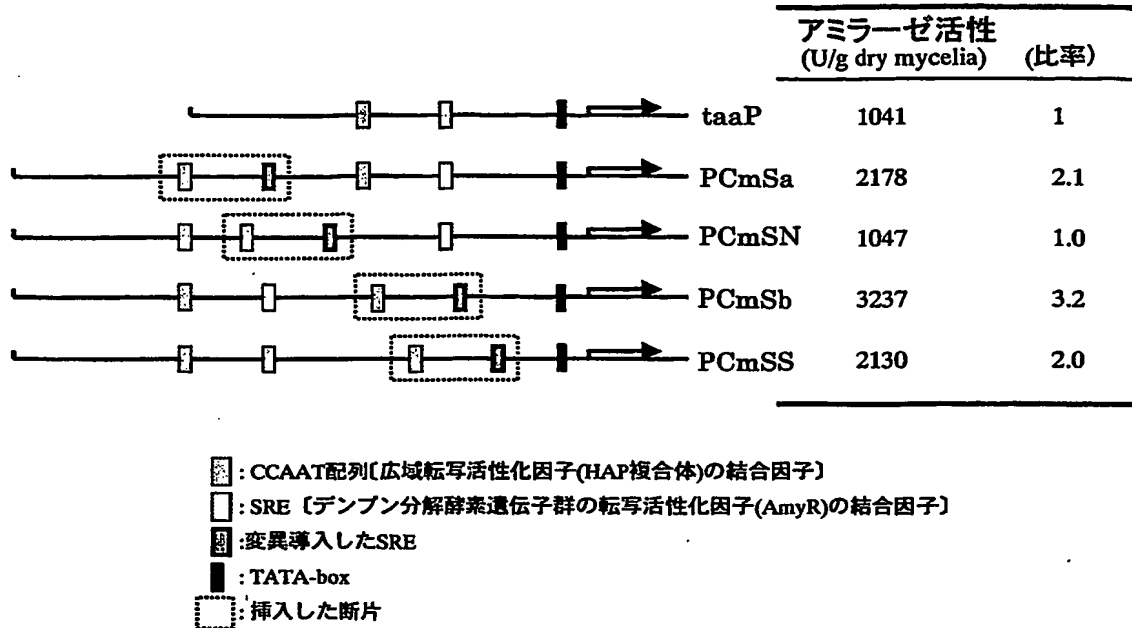


【図 5】



プロモーター	アミラーゼ活性			
	デンプン (U/g dry mycelia) (比率)		グルコース (U/g dry mycelia) (比率)	
taaP	1041	1	25	1
PCSB	4317	4.1	200	8.0
PCSP	4269	4.1	348	13.9
PCSPb	4434	4.3	1219	48.8

【図 6】



【図 7】

菌株	コピー数	アミラーゼ生産量 (g/L)	(比率)
ABPU1	0	0.01	
taa2	1	0.29	1
CSb17	1	1.46	5.0
CSb16	多	9.90	34.1
CSP6	多	6.41	22.1
CSPb19	多	7.35	25.3


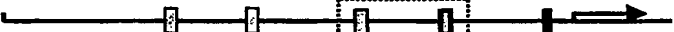

ABPU1 ; 宿主 taa2 ; 野生型プロモーター






【図 8】

菌株	アミラーゼ生産量 (g/L)		
	SPY培地	MPY培地	GPY培地
CSP6	6.41	4.86	2.94
CSPb19	7.35	5.25	6.25


アミラーゼ発現量はタカアミラーゼの比活性を100U/mgとしたときの換算値で示した。

【図 9】

	アミラーゼ活性 (U/g dry mycelia) (比率)	
 taaP	1041	1
 PCmSb	3237	3.2
 PsCmSb	1634	1.6

-  : CCAAT配列(広域転写活性化因子(HAP複合体)の結合因子)
 : SRE (デンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子(AmyR)の結合因子)
 : 変異導入したSRE
 : TATA-box
 : 挿入した断片

【図 10】

SRE配列		アミラーゼ活性 (U/g dry mycelia) (比率)	
			
CGGAAATTTAAAGG	taaP	1041	1
CGGAAATTTAA <u>C</u> GG	taaS	1209	1.2
CGGAAATTTAA <u>T</u> TA	MSRE2	792	0.8

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロモーターの発現制御に関与する塩基配列を提供する。また、この塩基配列の情報を基にプロモーターの改変を行い、高い発現活性を有する改変プロモーターを提供する。

【解決手段】 糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN（第1塩基配列）を含む第1DNA断片と、CGGNNNNNNNNNGG（第2塩基配列）を含む第2DNA断片と、を挿入した改変プロモーター。NはA（アデニン）、G（グアニン）、C（シトシン）、又はT（チミン）である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-055853
受付番号	50200289552
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 3月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月 1日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000216162]

1. 変更年月日

2000年12月11日

[変更理由]

名称変更

住 所

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

氏 名

天野エンザイム株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.